

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication :
 (à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

2 771 421

(21) N° d'enregistrement national :

97 14920

(51) Int Cl⁶ : C 12 M 3/02 // C 12 M 3/06

BEST AVAILABLE COPY

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 27.11.97.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 28.05.99 Bulletin 99/21.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : BERTIN ET CIE Société anonyme — FR et ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE PARIS — FR.

(72) Inventeur(s) : MILANDE NICOLAS et DOUAY LUC.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : MARTINET ET LAPOUX.

(54) DISPOSITIF D'AMPLIFICATION DE CELLULES HEMATOPOIETIQUES ET SES APPLICATIONS.

(57) Dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur adapté à la culture de cellules hématopoïétiques ainsi que ses applications.

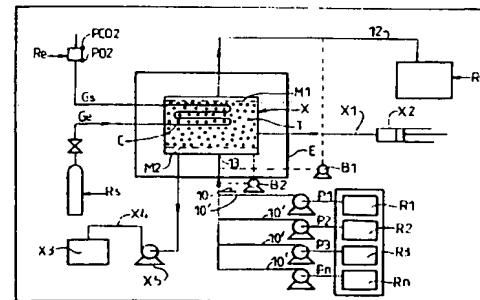
Ce dispositif comprend une chambre de culture cellulaire (X), délimitée par une enceinte et dans laquelle les cellules à amplifier sont confinées; ce dispositif est caractérisé :
 * en ce que ladite chambre de culture comprend une paroi intérieure constituée par un tamis micronique (M₁) qui présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 Mm, et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire,

- en ce qu'elle inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméable aux gaz, et
 * en ce que ladite chambre de culture comporte, en outre :

- un collecteur d'entrée (13) de milieu de culture qui coïncide avec des moyens d'apport du milieu de culture frais (R₁...R_n, 10, 10'), des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation (P₁...P_n) dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, ledit moyen de régulation permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambre/ jour et un collecteur de sortie (14) du milieu de culture, qui 0 et 50 volumes-cham-

bre/ jour et un collecteur de sortie (14) du milieu de culture, qui coïncident avec des moyens de mise sous pression, ainsi que

- des moyens d'ensemencement (X₁, X₂) des cellules à amplifier et
 - des moyens de collecte (X₃) des cellules amplifiées.



La présente invention est relative à un dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur adapté à la culture de cellules hématopoïétiques (cellules sanguines, progéniteurs hématopoïétiques et cellules souches) ainsi que ses applications : procédé d'amplification de cellules hématopoïétiques, en milieu stérile, appareil et kit de culture.

Les cellules sanguines circulantes morphologiquement reconnaissables incluent les érythrocytes, les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les différents lymphocytes et les plaquettes. Ces cellules matures dérivent de cellules précurseurs : érythroblastes pour les érythrocytes, myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes pour les différents granulocytes et mégakaryocytes pour les plaquettes. Les cellules précurseurs dérivent elles-mêmes de cellules plus primitives : les cellules souches et les progéniteurs.

Les cellules souches ont une capacité d'auto-renouvellement et d'auto-maintien étendue ; certaines des cellules souches se différencient selon les besoins, alors que d'autres s'auto-renouvellent pour maintenir un *pool* de cellules souches, apte à répondre à la demande. Ainsi, outre la possibilité d'assurer leur renouvellement, les cellules souches pluripotentes sont capables de différenciation en différentes lignées de progéniteurs qui présentent une capacité d'auto-renouvellement plus limitée. Ces progéniteurs, sont capables de prolifération et de différenciation sous la forme de cellules précurseurs reconnaissables morphologiquement.

Les cellules souches et les progéniteurs constituent un très faible pourcentage des cellules nucléées de la moelle osseuse, de la rate, du sang périphérique et du sang de cordon.

La reconstitution du système hématopoïétique, dans les pathologies où une telle reconstitution est nécessaire, est généralement réalisée par transplantation de moelle osseuse. Dans une transplantation de moelle osseuse réussie, le sang, la moelle osseuse, la rate, le thymus et les autres organes de l'immunité du receveur sont renouvelées avec les cellules issues du donneur.

Toutefois, la greffe de moelle osseuse présente les inconvénients des transplantations (réaction du greffon contre l'hôte, par exemple), qui sont sources de mortalité et de morbidité.

C'est pourquoi d'autre sources de cellules hématopoïétiques et notamment de cellules souches ont été recherchées. Toutefois, l'utilisation directe aussi bien du sang périphérique que des cellules d'autres origines (cellules de foie fœtal, sang de cordon), qui ont été testés comme source de cellules souches, en vue d'une 5 reconstitution hématopoïétique, fournissent des résultats variables. En effet, la transplantation de cellules souches est limitée par plusieurs facteurs : les procédures d'obtention de cellules à partir de moelle osseuse sont fastidieuses et le nombre de cellules utiles obtenues est limité. En outre, la cinétique de régénération des cellules sanguines matures après transfusion n'est pas idéale.

10 Afin de pallier les inconvénients, induits par l'utilisation de cellules de diverses origines, des méthodes de manipulation *ex vivo* des cellules hématopoïétiques ont été proposées, qui s'inspirent des travaux réalisés dans le domaine des manipulations génétiques.

15 Certaines conditions doivent être respectées pour la production de cellules : (1) il doit s'agir de cellules du sujet à traiter ou d'un donneur, qui sont capables de réplication et de différenciation, quand nécessaire et (2) l'on doit disposer d'un système *ex vivo*, adapté à la croissance des cellules concernées (matériaux d'adhésion des cellules, échange de milieu, oxygénation...).

20 Des systèmes de culture de cellules hématopoïétiques ont déjà été proposés, par expansion des cellules souches *ex vivo*, dans des conditions qui ont été élaborées au fil des ans (S.G. Emerson, *Blood*, 1996, 87, 3082-3088).

A l'heure actuelle, il existe essentiellement deux grandes techniques :
- les cultures à long terme conventionnelles de cellules sélectionnées : on incube, par exemple, des cellules CD34⁺ avec une combinaison de cytokines à 25 hautes doses (*high dose cytokines* ou HDC) ; toutefois ces cultures ne correspondent pas à une vraie expansion des cellules souches mais correspondent plutôt à une différenciation efficace de progéniteurs. En effet, les cultures à long terme (CLT) doivent être entretenues par une demi-dépopulation du milieu et des cellules, une à deux fois par semaine ; une telle procédure limite la persistance des cellules souches hématopoïétiques. De tels systèmes ne permettent pas de contrôler la tension d'oxygène, le pH et les métabolites. Lorsque les cytokines sont ajoutées régulièrement, les problèmes de déplétion en facteurs nutritifs sont exacerbés, en raison notamment de l'augmentation 30

importante de la prolifération cellulaire. La limitation de la production des cellules hématopoïétiques en culture est due, en partie, à des conditions d'entretien de la culture suboptimales. En effet, les progéniteurs hématopoïétiques en CLT sont en cycle, uniquement pendant les un à trois jours qui suivent le renouvellement de tout ou 5 partie du milieu, et restent dormants jusqu'au prochain entretien. Le retrait du milieu de culture affecte particulièrement la fonction des cellules stromales (production de GM-CSF ou *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, Emerson G.S, 1996, précité), lors des changements de milieu. En outre, l'accumulation de cellules matures dans la culture entraîne une augmentation de la production des inhibiteurs de prolifération. 10 L'augmentation du rythme de changement de milieu améliore considérablement la productivité et la longévité de ce type de culture. Toutefois, de telles cultures ont l'inconvénient majeur de ne pas permettre d'obtenir des densités cellulaires élevées.

- les cultures en perfusion continue : il s'agit de systèmes (bioréacteurs) qui développent les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques, dans lesquels le milieu de culture frais est apporté en perfusion continue ; de tels systèmes permettent ainsi un échange rapide du milieu, stimulent la fonction des cellules stromales et stimulent la production de GM-CSF. De telles cultures ont notamment été décrites dans les publications au nom de M.R. Koller et al. (*Blood*, 1993, 82, 2, 378-384 ; *Exp. Hematol.*, 1995, 23, 1275-1283). Les bioréacteurs utilisés 15 sont issus des technologies de culture de cellules animales et sont plutôt conçus pour récupérer les molécules synthétisées par les cellules. C'est le cas pour les systèmes dits à fibres creuses tels que décrits dans les Demandes Endotronics EP 0 220 650, EP 0 480 400 et EP 0 537 551. De tels systèmes sont peu adaptés à la culture des cellules elles-mêmes ; en effet, dans ces systèmes, le milieu nutritif, dans lequel 20 l'oxygène est dissous, passe au travers de fibres creuses et perfuse à travers elles vers la zone de culture (espace entre les fibres), ce qui entraîne un épuisement rapide de l'oxygène par rapport aux autres nutriments, lorsque les concentrations cellulaires sont élevées.

En vue d'adapter les bioréacteurs à la culture des cellules, et notamment de rendre les cultures de cellules biologiques, et plus particulièrement de cellules hématopoïétiques, reproductibles, la Demande Internationale WO 96/40858 décrit un 25 système de culture de cellules hématopoïétiques qui comprend une chambre de culture

cellulaire délimitée par une paroi inférieure en plastique sur laquelle sont distribuées les cellules à cultiver et une paroi supérieure qui se présente sous la forme d'une membrane perméable aux gaz et imperméable aux liquides. Le milieu de culture frais est introduit dans cette chambre de culture, sous pression d'air et à débit déterminé

5 (formation de bulles dans le milieu) ; l'oxygène et les autres gaz sont introduits dans la chambre par l'intermédiaire de la paroi supérieure (membrane), à partir d'une chambre de réception des gaz.

Tant pour l'inoculation des cellules que pour l'introduction du milieu frais, le système est positionné sur un premier instrument de contrôle comportant une

10 plate-forme de réception dudit système de culture, qui est soumis à une agitation, alors que pour la culture proprement dite (environ pendant deux semaines), le système, également soumis à une agitation séquentielle, est transféré sur un deuxième instrument de contrôle (incubateur). Le système décrit dans cette Demande Internationale comprend en outre des moyens d'évacuation du milieu de culture usé et des moyens de récupération

15 des cellules.

Un tel système est mieux adapté à la culture de cellules hématopoïétiques ; toutefois, il présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients :

- le milieu de culture est apporté sous pression d'air, qui est néfaste pour l'amplification des cellules hématopoïétiques (croissance faible des cellules) ;
- 20 - la répartition des cellules par agitation n'est pas homogène et peut également nuire à la croissance ;
- le transfert du système du premier instrument de contrôle vers le deuxième instrument de contrôle (incubateur) alourdit la procédure ;
- 25 - l'oxygène, fourni par l'intermédiaire de la paroi supérieure de la chambre de culture (membrane), n'est pas réparti de manière homogène dans toute la zone de culture ; et
- le système n'est pas adapté à une optimisation des conditions de culture (combinaison optimale en facteurs de croissances, par exemple).

D'autres systèmes ont également été décrits pour l'expansion de

30 cellules thérapeutiques ; en particulier, le Brevet US 5 622 857 décrit un bioréacteur comprenant une chambre de culture de cellules qui contient un faisceau central de fibres creuses poreuses pour le passage du milieu frais, disposé selon l'axe longitudinal

de la chambre et entouré d'un faisceau annulaire de fibres creuses perméables aux gaz ; ils ne permettent pas une répartition homogène des gaz et des réactifs dans l'ensemble de la chambre de culture et peuvent entraîner un colmatage.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pallier ces 5 inconvénients en proposant un système, dans lequel :

- l'apport d'oxygène est contrôlé de manière indépendante de l'apport de milieu nutritif, en continu et avec une répartition homogène sur toute la zone de culture et ce, en évitant tout contact avec l'air et toute formation de bulles dans la zone de culture ; et

10 - il est possible de modifier les conditions de culture à tout moment, afin de maintenir des conditions optimales de croissance des cellules hématopoïétiques.

La présente invention a pour objet un dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques, du type comprenant une chambre de culture cellulaire, délimitée par une enceinte et dans 15 laquelle les cellules à amplifier sont confinées, lequel dispositif est caractérisé :

* en ce que ladite chambre de culture cellulaire comprend au moins une paroi intérieure constituée par un tamis micronique assurant le confinement des cellules en suspension dans un milieu de culture liquide et permettant la sortie du milieu usé, lequel tamis micronique présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 μm , 20 et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire,

- en ce qu'elle inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméable aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, et

* en ce que ladite chambre de culture cellulaire comporte, en outre :
25 - un collecteur d'entrée de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture frais, des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation (pompes, électrovannes, ...) dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, le moyen de régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie du milieu 30 de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que
- des moyens d'ensemencement des cellules à amplifier et

- des moyens de collecte des cellules amplifiées.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le dit milieu frais est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration frontale.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le dit milieu de culture est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration tangentielle, au moyen d'une nappe de tubes (T) à paroi perméable au milieu de culture frais, rigides et de diamètre compris entre 1 mm et 20 mm, montés en parallèle entre ledit collecteur d'entrée et ledit collecteur de sortie, lesdits tubes (T) étant montés dans un circuit en boucle fermée et parcourus chacun de bout en bout par un débit de milieu de culture frais plusieurs fois supérieur à celui traversant sa paroi, pour maintenir une pression entraînant une perte de charge, lorsque le milieu de culture frais traverse les parois des tubes, supérieur à 10 mbars.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, le débit du milieu parcourant chaque tube (T) correspond à une vitesse d'écoulement, comprise entre 0,1 et 1 dm/s, qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais à travers la paroi desdits tubes.

Selon une modalité avantageuse de ce mode de réalisation, l'ensemble des capillaires (C) sont disposés à intervalle sensiblement égaux pour former, de l'un et/ou de l'autre côté de la nappe de tubes (T), un/plusieurs sous-ensembles.

L'apport de milieu de culture par filtration tangentielle permet une bonne répartition du milieu dans la chambre de culture, sans stress hydrodynamique, particulièrement néfaste pour ces cellules et également une bonne répartition des cellules en suspension dans l'ensemble de la chambre de culture.

Le dispositif selon la présente invention peut inclure des variantes relatives à la disposition des capillaires et des tamis microniques, telles que décrites dans le Brevet européen EP 0 478 847.

En particulier :

- les sous-ensembles de capillaires peuvent être simples et constituer une seule couche ;

- lesdits sous-ensembles de capillaires peuvent être eux-mêmes formés de plusieurs couches superposées de capillaires parallèles entre eux, les capil-

laires d'une couche régnant au droit des intervalles entre capillaires des deux couches adjacentes ;

- lesdits capillaires sont des tuyaux perméables aux gaz de diamètre compris entre 0,5 et 5 millimètres, à paroi hydrophobe ;

5 - ludit tamis micronique (M) recouvre au moins chaque face libre aval de l'ensemble des capillaires ;

- les capillaires (C) peuvent être orientés parallèlement au plan de la nappe des tubes (T), peuvent être parallèles aux tubes (T) ou répartis dans l'espace cellulaire libre entre les tubes (T) ;

10 - la nappe de tubes (T) et l'ensemble ou sous-ensembles de capillaires (C) sont séparés par un tamis micronique (M'1, M'2) semblable au tamis micronique (M) formant la troisième paroi dudit dispositif ;

15 - le dispositif peut constituer un module unilatéral, comprenant un seul ensemble de capillaires (C) situé d'un côté de la nappe de tubes (T) et au moins un tamis micronique aval (ou de sortie) (M), un module bilatéral ou symétrique, comprenant au moins deux sous-ensembles de capillaires (C) s'étendant respectivement de chaque côté de la nappe de tubes (T) et au moins un tamis micronique aval (ou de sortie) (M1, M2), recouvrant chaque sous-ensemble de capillaires (C) ou il comprend au moins deux modules symétriques superposés, avec suppression éventuelle des espaces de sortie et tamis microniques intermédiaires ;

20 - le dispositif peut aussi comprendre une enceinte (E) traversée par au moins deux nappes de tubes (T) et dont l'espace entre les tubes (T) est rempli de capillaires (C) parallèles auxdits tubes, entre deux tamis microniques (M1, M2) d'extrémité.

25 Un tel bioréacteur permet de contrôler l'apport d'oxygène de façon indépendante de l'apport de milieu de culture frais, en continu, avec une répartition homogène sur toute la zone de culture, grâce au réseau de capillaires qui la parcourt. Une telle structure est particulièrement bien adaptée à la culture de cellules hématopoïétiques, car elle se rapproche de la situation *in vivo* des capillaires sanguins.

30 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit bioréacteur, il inclut en outre un circuit en boucle fermée de recyclage du milieu usé.

Un tel bioréacteur permet en outre d'apporter le milieu de culture frais et d'éliminer ou de recycler le milieu usé en continu et de modifier le flux et la composition du milieu de culture, selon les besoins (optimisation des conditions de culture).

5 Selon un autre mode de réalisation dudit dispositif, il comprend en outre un système de mesure optique pour suivre en continu la densité cellulaire.

Un tel bioréacteur est particulièrement bien adapté à la mise en œuvre d'un procédé d'amplification de cellules hématopoïétiques en milieu stérile qui comprend :

10 - la séparation des cellules hématopoïétiques, notamment à partir de sang de cordon, de moelle osseuse ou de sang périphérique,

- la mise en suspension desdites cellules dans un milieu de culture convenable, tel qu'un milieu IMDM (*Iscove Modified Dulbecco's Medium*), (L Douay et al., *Br. J. Haematol.*, 1994, 86, 475-482), pour obtenir 10^3 à 10^9 cellules hématopoïétiques/ml,

15 - l'injection de ladite suspension, à une vitesse n'endommageant pas lesdites cellules, dans un dispositif tel que défini ci-dessus, alimenté simultanément avec des gaz convenables (O_2 et CO_2), un milieu de culture liquide frais et des facteurs de croissance, de manière à ce que le débit de milieu de culture frais soit compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et à ce que le flux de facteurs de croissance soit dissocié et séquentiel par rapport au flux de milieu de culture liquide frais,

20 - la culture desdites cellules pendant 6 à 28 jours à $37^\circ C$ en atmosphère enrichie en CO_2 (enrichissement en CO_2 compris entre 3,5 et 7,5 %) et appauvrie en O_2 (appauvrissement de l'ordre de 5 à 20 %) et

25 - la collecte (par exemple par chasse, par sédimentation ou par basculement du bioréacteur) des cellules en fin de culture.

Des conditions de culture optimales des cellules hématopoïétiques sont étudiées depuis plusieurs années et ont fait l'objet de publications (X. Drouet et al., *Br. J. Haematol.*, 1989, 73, 143-147 ; L Douay et al., *Br. J. Haematol.*, 1991, 79, 27-32 ; L. Douay et al., *Br. J. Haematol.*, 1994, 86, 475-482 ; A. Poloni et al, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1995, 37, 367-373) ; toutefois, il n'était pas possible, jusqu'à

présent de les mettre en oeuvre dans un procédé reproductible et permettant d'obtenir des densités cellulaires importantes, alors qu'une telle source de cellules hématopoïétiques présente un intérêt dans toutes les applications de ces cellules, notamment les greffes, la production de types cellulaires particuliers...etc.

5 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un bioréacteur comprenant une chambre de culture cellulaire délimitée par une enceinte et comprenant au moins une paroi intérieure sous la forme d'un tamis micronique assurant le confinement des cellules en milieu liquide et permettant la sortie du milieu de culture usé, lequel tamis micronique présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 μm

10 10 et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire, qui inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméables aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, un collecteur d'entrée de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture liquide frais, des moyens

15 15 d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, le moyen de régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambres/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie du milieu de culture, qui coopèrent

20 20 avec des moyens de mise sous pression, ainsi que des moyens d'ensemencement et des moyens de collecte des cellules, pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques.

La présente invention a également pour objet un kit de culture à usage unique pour l'amplification de cellules hématopoïétiques en milieu stérile, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif tel que défini ci-dessus.

La présente invention a, en outre, pour objet un appareil de culture pour l'amplification de cellules hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un dispositif, tel que défini ci-dessus, associé à des moyens de régulation des conditions de culture,

30 - un système de contrôle-commande incluant des moyens de saisie et de stockage des données nécessaires au contrôle dudit dispositif et notamment à la mise en service et à l'arrêt des moyens d'apport de milieu de culture frais, des moyens

d'apport des différents facteurs de croissance et des moyens de régulation des flux, suivant une séquence prédefinie et des moyens de régulation des conditions de culture (température, pH, teneur en O₂, ...),

- une enceinte thermostatée apte à recevoir ledit dispositif, et
- 5 - des réservoirs de réactifs disposés, dans des conteneurs réfrigérés (réservoir de milieu de culture frais et réservoirs de facteurs de croissance) ou non (réservoir de milieu de culture usé et réservoir de collecte des cellules en fin de culture).

Outre les dispositions qui précédent, l'invention comprend encore
10 d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1 et 2 représentent des vues schématiques d'un appareil mettant en oeuvre un bioréacteur (BR) selon l'invention, apte à la culture et à
15 l'amplification de cellules hématopoïétiques ;
- la figure 3 illustre l'expansion cellulaire des cellules de sang de cordon décongelées mises en culture dans un bioréacteur selon l'invention ;
- la figure 4 illustre l'expansion des différents compartiments après 14 jours de culture.

20 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

La figure 1 représente une vue schématique d'un appareil mettant en oeuvre un dispositif selon l'invention (bioréacteur) apte à la culture et à l'amplification
25 de cellules hématopoïétiques ; une chambre de culture cellulaire (X) est incluse dans une enceinte thermostatée (E) ; ladite chambre de culture cellulaire X, délimitée par une enceinte, comprend :

- . une première paroi intérieure, située à l'une des extrémités de ladite chambre de culture cellulaire et constituée d'un premier tamis micronique M₁ qui
30 assure le confinement des cellules dans la chambre X mais permet le passage du milieu usé à récupérer, au niveau du collecteur de sortie 14,

un ensemble de capillaires C qui assurent le passage des fluides gazeux,

une deuxième paroi intérieure, située à l'extrémité opposée de ladite chambre de culture cellulaire et constituée d'un second tamis micronique M₂, qui assure 5 le confinement des cellules dans la chambre X, à l'autre extrémité de ladite chambre et, éventuellement un deuxième ensemble de capillaires C (non représenté sur cette figure).

Les moyens d'apport en milieu frais sont dissociés et comprennent plusieurs réservoirs (R₁...R_n), situés dans un conteneur réfrigéré ; ils comprennent des 10 réactifs différents, dont le débit d'entrée dans la chambre de culture cellulaire X est modulable : les différents réservoirs sont reliés entre eux par des tubulures 10' débouchant dans une canalisation 10, et coopèrent avec des moyens de régulation du débit desdits réactifs (pompes d'appoint en réactifs P₁-P_n) ; la canalisation 10 est reliée à un collecteur d'entrée 13 des réactifs.

15 Ledit bioréacteur comprend en outre des moyens d'injection X₂ stériles des cellules hématopoïétiques, reliés à la chambre de culture cellulaire X par la tubulure X₁ et des moyens de collecte X₃ des cellules en fin de culture, reliés à la chambre de culture cellulaire X par la tubulure X₄, éventuellement associée à une pompe d'aspiration X₅.

20 Des conduits 12 de sortie du milieu usé, débouchant en aval du tamis M₁ permettent d'extraire ledit milieu usé collecté, au niveau du collecteur 14.

Des moyens d'entrée Ge et de sortie G_s des fluides gazeux sont reliés respectivement à un volume d'alimentation (R_s) des capillaires C et un volume d'échappement (R_e) des capillaires.

25 Dans la réalisation illustrée à la figure 1 :

- les capillaires C sont, dans le même plan ;
- en amont de l'entrée gazeuse Ge, on peut trouver un filtre stérile ;
- la chambre de culture cellulaire X est associée à un dispositif de régulation de la température, à des moyens d'injection des cellules hématopoïétiques 30 (X₂, X₁) et à des moyens de collecte des cellules en fin de culture (X₃, X₄, X₅) ;

- le milieu frais et les facteurs de croissance sont introduits par filtration frontale, au niveau du collecteur d'entrée 13 ;

5 - les conduits d'évacuation de milieu usé (moyens 12) peuvent être associés à des réservoirs appropriés (R_u) et sont remis en circulation (boucle fermée B1).

Le fonctionnement de tels bioréacteurs est le suivant :

Après programmation de la température, du pH, et du débit des gaz et des réactifs, on inocule une quantité appropriée de cellules dans la chambre de culture cellulaire X et l'on régule le débit des réactifs provenant des différents réservoirs 10 ($R_1 \dots R_n$) par les moyens d'apport (10', 10) vers le collecteur 13. On surveille :

- le débit de milieu frais, de manière à ce qu'il soit modulé, en fonction des cellules à cultiver et du stade d'avancement de la culture (variation de la vitesse de renouvellement du flux de milieu, dont la composition varie en fonction du temps) ainsi que

15 - les paramètres précisés ci-dessus (température, pH, densité cellulaire et concentrations en O_2 et en CO_2).

Simultanément, les cellules sont alimentées en oxygène et en gaz carbonique par l'intermédiaire des capillaires C, répartis uniformément dans la chambre de culture cellulaire (espace délimité par les parois intérieures constituées les tamis 20 microniques d'extrémité, à partir d'une arrivée gazeuse Ge). Les capillaires diffusent le gaz de l'intérieur de chaque capillaire vers les cellules mais s'opposent à la diffusion de liquide à l'intérieur desdits capillaires. La sortie Gs des gaz permet également l'évacuation du CO_2 produit par les cellules en culture. La sortie de gaz Gs permet d'évacuer l'oxygène et le gaz carbonique non utilisés.

25 Un tel bioréacteur d'un volume qui peut varier de 1 cm^3 à 10 l, permet de réaliser des cultures en continu.

Dans une réalisation préférée mais non limitative dudit bioréacteur :

30 . les capillaires C d'alimentation en fluides gazeux, sont sous la forme d'une pluralité de tuyaux perméables aux gaz espacés régulièrement dans la chambre cellulaire X, d'un diamètre de 2,6 mm dans la réalisation représentée, et sont situés dans l'ensemble de la chambre de culture cellulaire X.

On inocule dans le dispositif stérile, par exemple et ce de manière non limitative, des cellules de cordon (10^6 cellules/ml de milieu, à la vitesse de 0,5 ml/min.).

Le milieu frais à composition modulable est ensuite introduit par la tubulure d'entrée 10 vers le collecteur 13, avec un débit variable d'alimentation compris 5 entre 1 et 6 volume-chambre/j.

Les cellules produites sont récupérées de préférence entre le 8^{ème} et le 21^{ème} jour.

Les cellules obtenues peuvent avantageusement être utilisées dans toutes les applications de ces cellules (greffes, production de types cellulaires particuliers). 10

Lorsque le bioréacteur prévoit que le milieu frais est introduit par filtration tangentielle (figure 2), il comprend outre les moyens tels que définis à la figure 1, des tubes T d'alimentation en milieu frais, par exemple d'un diamètre de 1 cm, qui sont rigides ; ces tubes sont dans la réalisation représentée à la figure 2, et de manière non limitative, en graphite compacté recouvert d'une couche sensible permettant le contrôle du diamètre des pores et ont été préalablement stérilisés ; dans ce cas : 15

un premier sous-ensemble de capillaires C assurent le passage des fluides gazeux et sont disposés entre le tamis M₁ et une nappe de tubes T, parallèles entre eux et qui assurent le passage du milieu nutritif frais vers les cellules,

20 un second tamis micronique M₂ qui assure le confinement des cellules dans la chambre X, à l'autre extrémité de ladite chambre est associé à un deuxième sous-ensemble de capillaires C, disposé entre le tamis M₂ et la nappe de tubes T.

Les tubes T peuvent éventuellement être montés en parallèle entre 25 deux collecteurs alimentés suivant un circuit en boucle fermée incluant une tubulure d'entrée d'apport du milieu nutritionnel frais et une tubulure de sortie dudit milieu frais à recycler, lesquelles tubulures sont reliées entre elles par une canalisation (figure 2, B2).

Dans la réalisation illustrée à la figure 2 :

30 - les capillaires C sont, dans le même plan, perpendiculaires aux tubes T et sont disposés en deux sous-ensembles, de part et d'autre de la nappe de tubes T ;

- en amont de l'entrée gazeuse Ge, on peut trouver un filtre stérile ;
- la chambre de culture cellulaire X est associée à un dispositif de régulation de la température, à des moyens d'injection des cellules hématopoïétiques (X₂, X₁) et à des moyens de collecte des cellules en fin de culture (X₃, X₄, X₅) ;
- 5 - les conduits d'évacuation de milieu usé (moyens 12) peuvent être associés à des réservoirs appropriés.

EXEMPLE 1 :

* *Matériel et méthodes.*

- Séparation des cellules issues du sang de cordon :

10 40 ml de sang de cordon sont recueillis à la maternité dans des poches prévues à cet effet (poches Macopharma réf. MSA 1200A). La poche est manipulée dans les 2 heures suivant le recueil. Le sang est dilué volume à volume dans du PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ (Gibco), centrifugé en tube de 15 ml à 1 300 g pendant 10 min. Le *buffy coat* (« galette » de leucocytes totaux) est aspiré à la pipette pasteur, puis 15 resuspendu dans du milieu d'Iscove modifié par Dulbecco (IMDM, Gibco). La viabilité des cellules est déterminée par exclusion au bleu trypan (Gibco). Les cellules sont ajustées à 2.10⁷ cellules/ml en IMDM et maintenues à +4°C jusqu'à la congélation. Le milieu de congélation, contenant 80 % de sérum de veau foetal (SVF) et 20 % de 20 DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma D2650), est lui aussi réfrigéré à +4°C avant son utilisation. Ce mélange est déposé goutte à goutte sur les cellules du *buffy coat*. Les cellules sont alors transvasées dans des cryotubes et maintenues à -80°C jusqu'à utilisation.

25 La décongélation des cellules s'opère rapidement par immersion du cryotube dans un bain-marie à 39°C. Les cellules décongelées sont immédiatement diluées au 1/20 dans un mélange d'IMDM + 10 % SVF et lavées une fois à +4°C. Les cellules sont resuspendues en IMDM + 0,5 % BSA (sérum albumine bovine, Sigma A4503) et la viabilité des cellules est déterminée.

- Cultures liquides :

30 Les cellules sont suspendues à 10⁶ cellules/ml dans un milieu de base défini sans sérum (SF) contenant 10 mg/ml d'acide folique (F7876, Sigma), 2,6 mM de L-glutamine (Gibco), 1,5 U/ml d'héparine (Fournier), 10⁻⁶ M d'hémisuccinate d'hydrocortisone (H4881, Sigma), 40 U/ml de pénicilline et 40 mg/ml de streptomycine

(Gibco). Le milieu est supplémenté par 5 mg/ml de BSA, 150 mg/ml de transferrine humaine saturée en fer (T7786, Sigma), 100 mg/ml d'insuline recombinante humaine (I0259, Sigma), 30 mg/ml de lécithine de soja (P3782, Sigma) et 7,5 mg/ml de cholestérol (C3045, Sigma).

5 Le milieu défini sans sérum est supplémenté par 100 ng/ml de *Stem Cell Factor* (SCF, Immunex), 100 ng/ml de ligand de FLT3 (ligand pour le récepteur de la thyrosine kinase Flat-/flak2) (FLT3-I, Immunex), 5 ng/ml d'IL3 (Sandoz), 10 ng/ml d'IL6 (Sandoz), 10 ng/ml de G-CSF (Shugai Rhone Poulenc) et 0,5 U/ml d'érythropoïétine (Epo, Behring).

10 - Ensemencement des Bio-Réacteurs (BR) :

a) Préparation des BR :

Avant utilisation, les BR montés (circuit de tubulures, chambres d'incubation et flacon de recueil) sont autoclavés 30 min à 1 bar puis laissés quelques heures à température ambiante pour assurer leur descente en température.

15 Afin d'éliminer l'air résidant dans le montage, le circuit de tubulures des BR est alors purgé avec le milieu SF complet contenant les cytokines.

b) Ensemencement :

20 3,6 10^6 cellules de *buffy coat* décongelé du sang de cordon sont ajustées à 10^6 cellules/ml. Les cellules sont injectées dans la chambre d'incubation des BR (volume de la chambre 3,6 ml) à l'aide d'un moyen d'ensemencement, à la vitesse de 0,5 ml/min. Les BR ensemencés sont ensuite installés dans une étuve à 37°C alimentée en CO₂ à 5 %.

25 La ventilation des cellules est assurée à l'aide d'un compresseur aspirant directement l'atmosphère de l'étuve. Des moyens d'apport du milieu de culture frais, des moyens d'apport des différents facteurs de croissance, ainsi que des moyens de régulation dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance (pompes P1-Pn) permettent d'assurer aux cellules, une alimentation modulée en milieu. Pour l'expérience, 2 BR sont ensemencés, l'un (BR1) dont le débit sera constant pendant les 14 jours de la culture, c'est-à-dire : 3,6 ml/j soit 1 volume-chambre/j, l'autre (BR2) dont le débit variera de 1 à 4 vol-ch/j.

A partir du 5ème jour de la culture une numération cellulaire des BR est effectuée sur un aliquot quotidiennement ; le débit du BR2 étant ajusté en fonction de l'expansion cellulaire à concurrence de 4 vol-ch/j.

Parallèlement, un témoin de culture en condition statique est initié en 5 plaque 6-puits à raison de $1,8 \cdot 10^6$ cellules/1,8 ml. L'entretien du témoin est assuré à J6 par adjonction de 1,8 ml de milieu complet fraîchement préparé contenant les cytokines.

Au jour 14 de la culture, les cellules des BR et du témoin sont recueillies en totalité et lavées en PBS. La viabilité des cellules est déterminée. Sur 10 chaque échantillon, la morphologie des cellules est évaluée par une cytologie sur lame colorée au May Grünwald Giemsa. Les progéniteurs granulo-macrophagiques (CFU-GM) et érythroïdes (BFU-E) sont plantés à partir des différents échantillons. Les CFU-GM et BFU-E sont plantés en méthyl-cellulose (Sigma) stimulée par 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml d'IL3, 3 U/ml d'Epo, 20 ng/ml de GM-CSF et de G-CSF. La lecture des 15 colonies s'effectue après 14 jours d'incubation à 37°C sous 5 % CO₂. 2 500 cellules/boîte sont plantées à J0 de la culture et de 2 000 à $3 \cdot 10^4$ cellules à J14 en fonction du nombre de cellules obtenues à J14.

- **Expression des résultats :**

Les résultats sont exprimés en « fois d'expansion par rapport au J0 20 de la culture ». Pour cela, le nombre de cellules ou de progéniteurs obtenus au 14ème jour de la culture liquide est divisé par le nombre de cellules ou progéniteurs générés au départ de l'expérience.

* ***Résultats :***

La numération journalière sur des aliquots à partir du J5 des BR1 et 25 BR2 permet de suivre la cinétique d'expansion cellulaire sans qu'il soit nécessaire de « condamner » un BR uniquement à cet effet. A J14, la numération de l'aliquot est doublée par une numération effectuée sur la totalité des cellules récupérées. Après la chute drastique des cellules au cours de la première semaine dans les BR (comportement similaire dans le témoin), la production cellulaire réaugmente peu à peu 30 à partir du J9 de la culture. L'augmentation du débit dans le BR2 accentue la production cellulaire (figure 3). Celle-ci est 2,7 fois plus importante dans le BR à débit variable (BR2) comparativement au BR à débit constant (BR1). Il est intéressant de

constater que la production cellulaire du sang de cordon décongelé puis mis en culture en condition statique aboutit, elle, à une perte de 75 % des cellules par rapport au niveau initial, contrairement au BR2 (figure 4A).

La figure 4B montre que l'expansion des progéniteurs granulo-macrophagiques (CFU-GM) varie de 4 à 5 fois par comparaison à J0, par conséquent, l'amplification des cellules matures obtenues dans le BR2 (figure 4A) ne s'est pas opérée au détriment du compartiment hématopoïétique plus immature à savoir les CFU-GM.

Cette expérience illustre le fait que des cellules du sang de cordon non purifiées (puisque il s'agit de globules blancs totaux), congelées à -80°C pendant 3 mois et mises en culture 14 jours en présence d'un substitut de sérum supplémenté en cytokines dans un BR à débit constant sont capables d'assurer une production cellulaire 2,4 fois plus importante qu'en condition statique. Comparativement au témoin, cette production cellulaire peut-être amplifiée de plus de 6 fois lorsque le débit du BR augmente. De plus, l'expansion de cellules matures permet parallèlement une production réelle des progéniteurs CFU-GM (4 fois, comparativement au niveau initial).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques, du type comprenant une chambre de culture cellulaire (X), délimitée par une enceinte et dans laquelle les cellules à amplifier sont confinées, lequel dispositif est caractérisé :

* en ce que ladite chambre de culture cellulaire comprend au moins une paroi intérieure constituée par un tamis micronique (M_1) assurant le confinement des cellules en suspension dans un milieu de culture liquide et permettant la sortie du milieu usé, lequel tamis micronique (M_1) présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 μm , et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire,

- en ce qu'elle inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméable aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, et

* en ce que ladite chambre de culture cellulaire comporte, en outre :

- un collecteur d'entrée (13) de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture frais ($R_1 \dots R_n$; 10, 10'), des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation ($P_1 \dots P_n$) dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, le moyen de régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie (14) du milieu de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que

- des moyens d'ensemencement (X_1, X_2) des cellules à amplifier et
- des moyens de collecte (X_3) des cellules amplifiées.

2°) Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit milieu de culture frais est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration frontale.

3°) Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit milieu de culture est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration tangentielle, au moyen d'une nappe de tubes (T) à paroi perméable au milieu nutritionnel frais, rigides et de diamètre compris entre 1 mm et 20 mm, montés en parallèle entre ledit collecteur d'entrée (13) et ledit collecteur de sortie (14), lesdits tubes (T) étant montés

dans un circuit en boucle fermée et parcourus chacun de bout en bout par un débit de milieu nutritionnel frais plusieurs fois supérieur à celui traversant sa paroi, pour maintenir une pression entraînant une perte de charge, lorsque le milieu frais traverse les parois des tubes, supérieur à 10 mbars.

5 4°) Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que le débit du milieu parcourant chaque tube (T) correspond à une vitesse d'écoulement comprise entre 0,1 et 1 dm/s, qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais à travers la paroi desdits tubes.

10 5°) Dispositif selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce que l'ensemble de capillaires (C) sont disposés à intervalle sensiblement égaux pour former, de l'un et/ou de l'autre côté de la nappe de tubes (T), un/plusieurs sous-ensembles.

15 6°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un système de mesure optique (15) pour suivre en continu la densité cellulaire.

7°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il inclut en outre un circuit en boucle fermée (B1) de recyclage du milieu usé.

20 8°) Procédé d'amplification de cellules hématopoïétiques en milieu stérile, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la séparation des cellules hématopoïétiques, notamment à partir de sang de cordon, de moelle osseuse ou de sang périphérique,

- la mise en suspension desdites cellules dans un milieu de culture convenable, pour obtenir 10^3 à 10^7 cellules hématopoïétiques/ml,

25 30 - l'injection de ladite suspension, à une vitesse n'endommageant pas lesdites cellules, dans un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, alimenté simultanément avec des gaz convenables (O_2 et CO_2), un milieu de culture liquide frais et des facteurs de croissance, de manière à ce que le débit de milieu de culture frais soit compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et à ce que le flux de facteurs de croissance soit dissocié et séquentiel par rapport au flux de milieu de culture liquide frais,

- la culture desdites cellules pendant 6 à 28 jours à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ et appauvrie en O₂ et

- la collecte des cellules en fin de culture.

9°) Utilisation d'un bioréacteur comprenant une chambre de culture cellulaire (X) délimitée par une enceinte et comprenant au moins une paroi intérieure sous la forme d'un tamis micronique (M₁) assurant le confinement des cellules en milieu liquide et permettant la sortie du milieu de culture usé, lequel tamis micronique (M₁) présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 µm et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire, qui inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméables aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, un collecteur d'entrée (13) de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture liquide frais, des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance (R₁...R_n ; P₁...P_n ; 10 ; 10'), le moyen de régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambres/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie (14) du milieu de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que des moyens d'ensemencement (X₁ ; X₂) et des moyens de collecte (X₃) des cellules, pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques

10°) Kit de culture à usage unique pour l'amplification de cellules hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

11°) Appareil de culture pour l'amplification de cellules hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, associé à des moyens de régulation des conditions de culture,
- un système de contrôle-commande incluant des moyens de saisie et de stockage des données nécessaires au contrôle dudit dispositif et notamment à la mise en service et à l'arrêt des moyens d'apport de milieu de culture frais, des moyens

d'apport des différents facteurs de croissance et des moyens de régulation des flux, suivant une séquence prédéfinie et des moyens de régulation des conditions de culture,

- une enceinte (E) thermostatée apte à recevoir ledit dispositif, et
- des réservoirs de réactifs ($R_1 \dots R_n$) disposés, dans des conteneurs

5 réfrigérés (réservoir de milieu de culture frais et réservoirs de facteurs de croissance) ou non (réservoir de milieu de culture usé et réservoir de collecte des cellules en fin de culture).

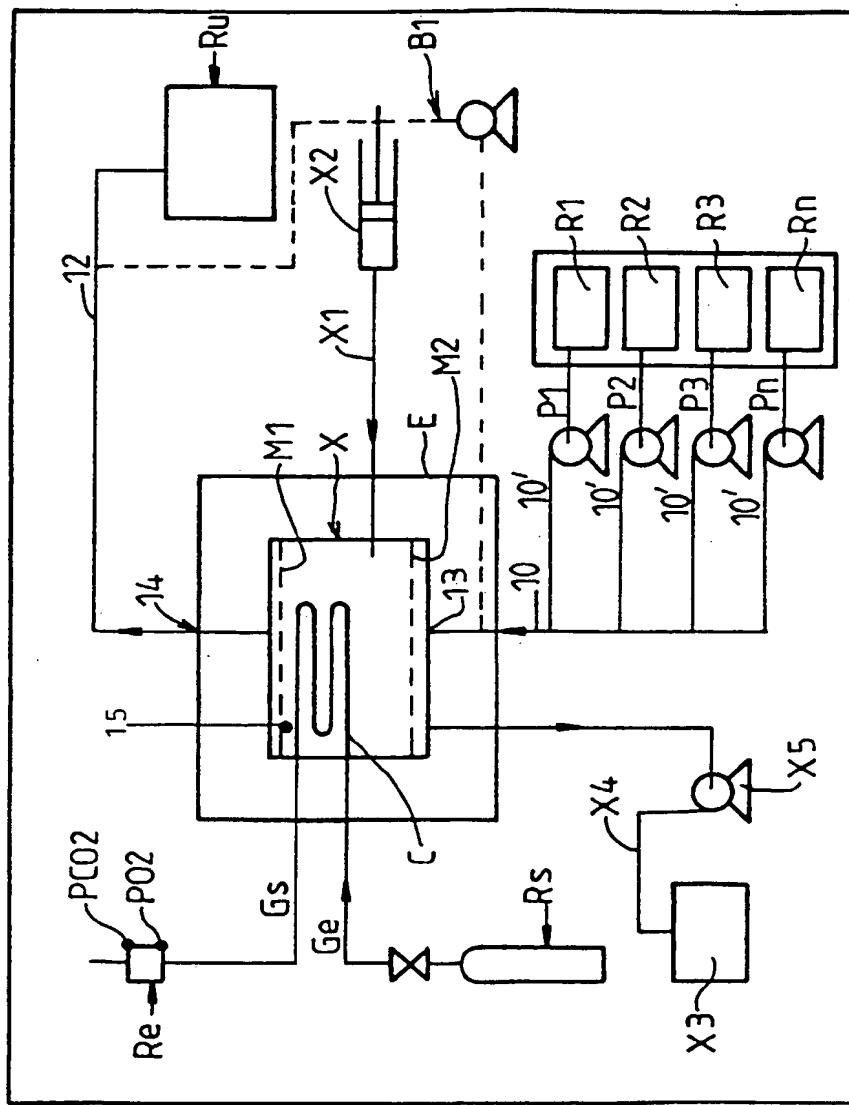


FIG.1

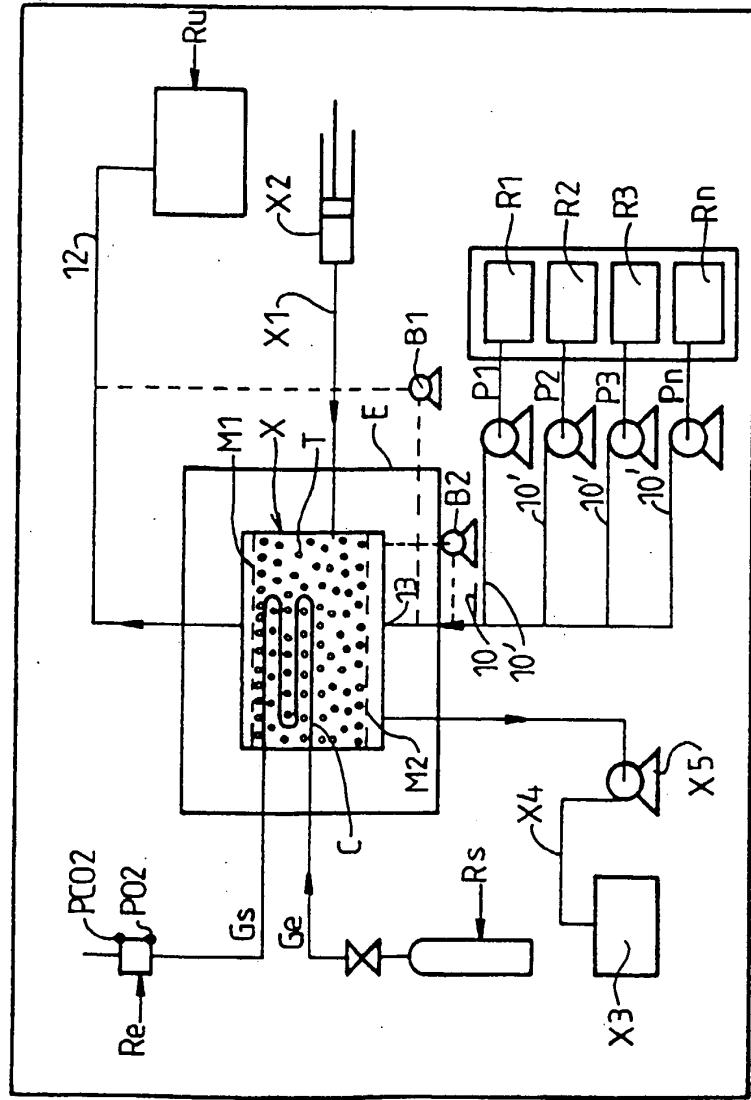


FIG. 2

3/4

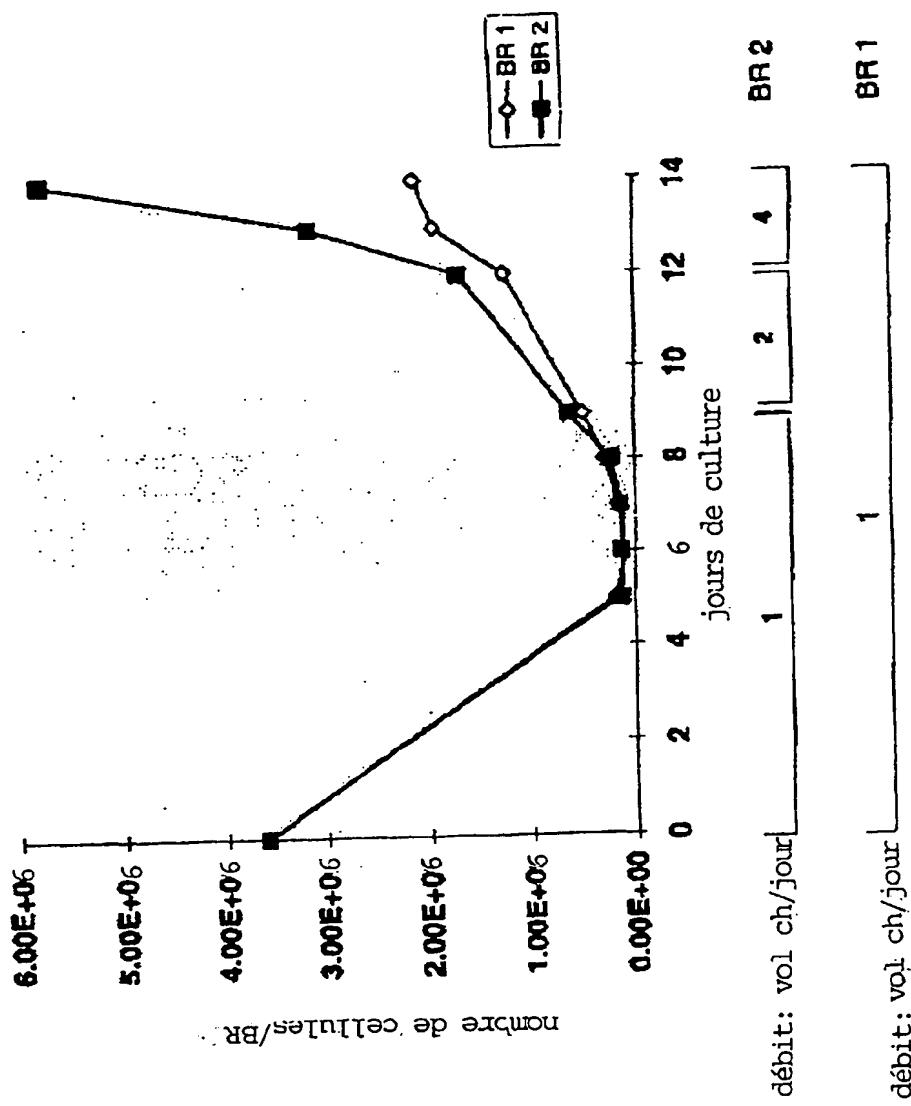


FIGURE 3

4/4

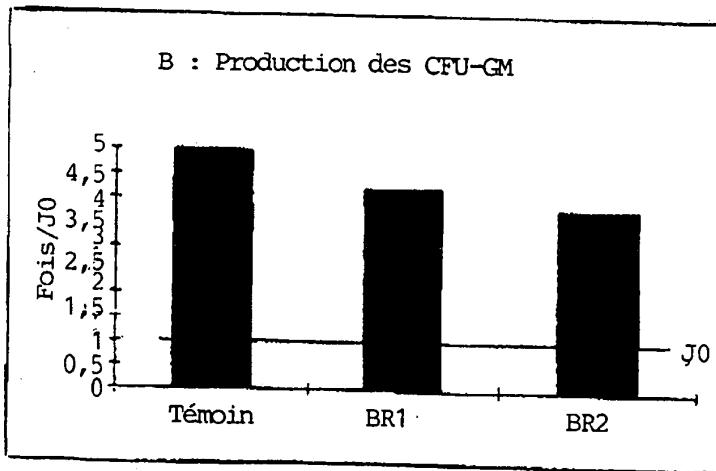
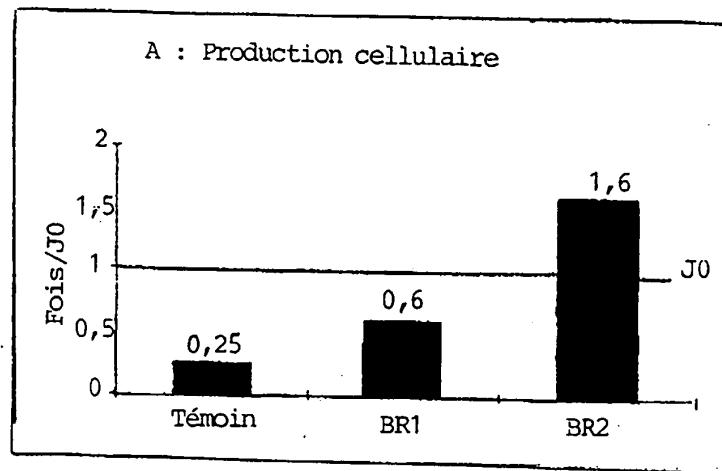


FIGURE 4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 550350
FR 9714920

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 91 15570 A (BERTIN & CIE) 17 octobre 1991	1-5, 7, 11
Y	* le document en entier *	8-10
D	& EP 0 474 847 A (BERZIN & CO)	
Y	WO 93 18132 A (UNIV MICHIGAN) 16 septembre 1993 * page 30; revendications; figures *	8-10
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)		
C12M		
1		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
9 septembre 1998		Coucke, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)